

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
11 de Diciembre de 2003 (11.12.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 03/102128 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: C12N
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES03/00247
- (22) Fecha de presentación internacional:  
23 de Mayo de 2003 (23.05.2003)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P200201253 31 de Mayo de 2002 (31.05.2002) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/Serrano, 117, 28006 MADRID (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): TORNÉ CUBIRÓ, José, María [ES/ES]; INSTO. BIOLOGIA MOLECULAR DE BARCELONA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, C/JORGE GIRONA SALGADO, 18-26, 08034 BARCELONA (ES). SANTOS LOZANO, María, Asunción [ES/ES]; INSTO. BIOLOGIA MOLECULAR DE BARCELONA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, C/JORGE GIRONA SALGADO, 18-26, 08034 BARCELONA (ES). TALAVERA BARO, David [ES/ES]; INSTO. BIOLOGIA MOLECULAR DE BARCELONA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, C/JORGE GIRONA SALGADO, 18-26, 08034 BARCELONA

- (ES). VILLALOBOS AMADOR, Enrique [ES/ES]; INSTO. BIOLOGIA MOLECULAR DE BARCELONA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, C/JORGE GIRONA SALGADO, 18-26, 08034 BARCELONA (ES). RIGAU LLOVERAS, Juan [ES/ES]; INSTO. BIOLOGIA MOLECULAR DE BARCELONA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, C/JORGE GIRONA SALGADO, 18-26, 08034 BARCELONA (ES).
- (74) Mandatario: REPRESA SÁNCHEZ, Domingo; CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, OFICINA DE TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA, C/Serrano, 113, 28006 MADRID (ES).
- (81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:  
— con informe de búsqueda internacional

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: MAIZE NUCLEOTIDE SEQUENCE CODING FOR A PROTEIN WITH TRANSGLUTAMINASE ACTIVITY AND USE THEREOF

(54) Título: SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE MAIZ CODIFICANTE DE UNA PROTEINA CON ACTIVIDAD TRANSGLUTAMINASA, Y SU USO

(57) Abstract: The invention relates to a DNA molecule from maize which codes for a protein with TGase activity and to a gene expression vector comprising said DNA molecule. The invention also relates to the use of the aforementioned DNA molecule or vector in order to produce transformed cells capable of expressing recombinant proteins with TGase activity, and to introduce the sequence coding for a protein with TGase activity into plant cells. In addition, the invention relates to the resulting transgenic plants and cells of micro-organisms. Furthermore, the proteins with TGase activity expressed from the above-mentioned DNA sequences can be used, for example, in food manipulation, processing and transformation.

(57) Resumen: La invención proporciona una molécula de ADN proveniente de maíz y codificante de una proteína con actividad TGasa, así como un vector de expresión génica que comprende esta molécula de ADN. Un objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicha molécula de ADN o vector para producir células transformadas capaces de expresar proteínas recombinantes con actividad TGasa, o para introducir dicha secuencia codificante de una proteína con actividad TGasa en células de plantas. Las células de microorganismos y las plantas transgénicas resultantes también constituyen objetos adicionales de esta invención. Además, estas proteínas con actividad TGasa expresadas a partir de dichas secuencias de ADN pueden ser empleadas, entre otros usos, en la manipulación, procesamiento y transformación de alimentos.

WO 03/102128 A1



---

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección  
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al  
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

## SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE MAIZ CODIFICANTE DE UNA PROTEINA CON ACTIVIDAD TRANSGLUTAMINASA, Y SU USO.

5

### SECTOR DE LA TECNICA

La invención se relaciona con la identificación de nuevas proteínas de origen vegetal con actividad TGasa y su uso en el campo de la manipulación, procesamiento y transformación de alimentos y en el desarrollo de plantas transgénicas con nuevas capacidades.

10

### ESTADO DE LA TECNICA

Las transglutaminasas (TGasa; EC2.3.2.13) (R-glutaminil-peptido-aminasa- $\gamma$ -glutamyl transferasa) catalizan uniones amidas entre un grupo amino primario de una poliamina o de una lisina (donador amino) y un grupo  $\gamma$ -carboxiamida de un residuo glutamil de algunas proteínas (amino receptor), mediante una reacción intermedia por la que el enzima se une al sustrato por reacción entre el grupo  $\gamma$ -carboxiamida del residuo glutamil de la proteína y un grupo sulfidrilo de un residuo de cisteína del centro activo del enzima (Serafini-Fracassini, D., Del Duca, S., & Beninati, S. 1995. Plant Transglutaminases. *Phytochemistry* 40: 355-365). El resultado de la actividad de la TGasa es: a) la modificación de la conformación de la propia proteína y b) otros cambios de conformación más extensos como resultado de uniones entre la misma proteína y entre proteínas diferentes para formar conjugados de elevado peso molecular.

15

20

Existen estudios con TGasas en humanos, también en animales, plantas, vertebrados inferiores, algunas bacterias, algas y levaduras (Makarova, K.S., Aravind, L. & Koovin, E.V. 1999. A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. *Protein Science* 8:1714-1719; Bergamini, C.M., Dean, M., Tanfani, F., Ferrari, C. & Scatturin. 1999. Conformational stability of human erythrocyte transglutaminase: patterns of thermal unfolding at acid and alkaline pH. *Eur. J.Biochem.* 266:575-582.; Cariello, L., Ristoratore, F. & Zanitti, L. 1997. A new transglutaminase-like from ascidian *Ciona intestinalis*. *FEBS Lett* 408:171-176; Lorand, L. & Conrad, S.M. 1984. Transglutaminases. *Mol Cell Biochem* 58:9-35; Serafini-Fracassini, D., Del Duca S. & Beninati S. 1995. Plant Transglutaminases.

25

30

Phytochemistry 40:355-365 ; Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Ichinose, A., Davie, EW, Kuma, K. & Miyata, T. 1993. Limulus hemocyte transglutaminase. cDNA cloning, amino acid sequence and tissue localization. J Biol Chem 268:262-268).

- 5 Las TGasas más conocidas son: el factor XIII de la coagulación de la sangre, que es una proteína del plasma, y la TGasa K implicada en la formación de la capa córnea de la epidermis. Por otro lado, ya han sido clonados algunos de los genes responsables de algunas de las TGasas citadas y se va conociendo la implicación de las TGasas en importantes procesos como la diferenciación celular, la estabilización de tejidos o la
- 10 muerte celular programada (Ichinose, A., Bottenus, R.E. & Davie E.W. 1990. Structure of transglutaminases. J. of Biol. Chemistry. 265(23): 13411-13414; Bergamini, C.M., Dean, M., Tanfani, F., Ferrari, C. & Scatturin. 1999. Conformational stability of human erythrocyte transglutaminase: patterns of thermal unfolding at acid and alkaline pH. Eur. J.Biochem. 266: 575-582; Nemes ,Z., Marekov, L.N. & Steinert, P.M. 1999.
- 15 Involucrin cross-linking by transglutaminase 1. J. of Biol. Chemistry. 274(16): 11013-11021). También estas enzimas parecen estar implicadas en enfermedades neurodegenerativas, tumores, enfermedades celíacas, etc, por ello son un grupo de enzimas de alto interés en los estudios clínicos. En torno a estos estudios clínicos existen diferentes patentes relacionadas con TGasas: US5,736,132 "Method of
- 20 promoting adhesion between tissue surfaces" solicitada por Orthogene, Inc. 1998; US 5,726,051 "Transglutaminase gene" solicitada por Oklahoma Medical Research Foundation, 1998.

- La función de las TGasas vegetales es menos conocida aunque los primeros datos sobre su existencia se publicaron hace ya unos años (Icekson I. & Apelbaun, A.
- 25 1987. Evidences for transglutaminase activity in plant tissue. Plant Physiol. 84. 972-974; Serafini-Fracassini D., Del Duca S., & D'Orazi D. 1988. First evidence for polyamine conjugation mediated by an enzyme activity in plants. Plant Physiol. 87:757). Los estudios en plantas se han centrado sobre todo en aspectos bioquímicos relacionados con la actividad, sustratos sobre los que actúa y tejidos donde abunda, pero
- 30 no se ha estudiado su papel funcional en los muchos procesos en que se tienen datos parciales sobre su intervención, como son: crecimiento y desarrollo, morfogénesis en general, fotosíntesis y muerte celular (Margosiak, S.A., Drama,A., Bruce-Carver, M.R., Gonzalez, A.P. Louie, D. & Kuehn. 1990. Identification of the large subunit of

ribulose1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase as a substrate for transglutaminase in *Medicago sativa* L. (Alfalfa). *Plant Physiol.* 92: 88-96; Del Ducca, S., Tidu, V., Bassi, R., Exposito, C., & Serafini-Fracassini, D. 1994. Identification of chlorophyll-a/b proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus* L. *Planta* 193: 283-289; Del Ducca, S., Della Mea, M., Muñoz de Rueda, P. & Serafini-Fracassini, D. 2000 Factors affecting transglutaminase activity catalizing polyamine conjugation to endogenous substrates in the entire chloroplast. *Plant Physiol Biochem* 38:429-439)

Además, se ha de destacar que la transglutaminasa tiene un valor añadido para finalidades biotecnológicas. Esta nueva faceta suplementaria como metabolito de interés, proviene de su capacidad de crear uniones covalentes entre proteínas distintas. Esta propiedad se ha usado por ejemplo para mantener la textura de alimentos como pescado y carnes, reduciendo la necesidad de utilizar sales (surimi, etc). Para la formulación de gelatinas de distinta densidad etc. Para preparar cocinados con menos grasas (tofu). También es capaz de mantener la consistencia, elasticidad, humedad o viscosidad de un producto en diferentes temperaturas. Se usa asimismo en distintos procesados lácticos: quesos, yogures, helados, etc. Tanto es así, que actualmente se usa como "aditivo" en muchos procesados bioalimentarios, siendo la dosis recomendada en USA para este uso de 65 ppm.

Todas estas posibilidades de la TGasa han generado la formulación de diferentes patentes sobre: métodos de obtención, utilización etc. y han hecho de esta substancia un producto comercial como por ejemplo los que viene distribuyendo la empresa Ajinomoto, con el nombre de: Activa TG®. Las empresas que comercializan el producto son Ajinomoto Co. Inc de Tokio (extendida también en Norteamérica) y Rohm Enzyme de USA ([www.skidmore-sales.com/whatsnew/newsletter/summer2001.pdf](http://www.skidmore-sales.com/whatsnew/newsletter/summer2001.pdf)). Sin embargo, en España no se ha localizado ninguna empresa que se dedique a la producción industrial de TGasa.

La primera TGasa que se ha sobreexpresado para fines comerciales como los antes indicados, se realizó en bacterias (*Streptoverticillium sp.*) por la empresa Ajinomoto, quién patentó el procedimiento y las diferentes mejoras posteriores de este protocolo inicial (US5,156,956 "Transglutaminase" (1992)). Asimismo esta misma empresa tiene patentado, otro sistema similar, pero mediante la transformación de

*Crassostrea gigas* (US5,736,356 "Transglutaminase originating from *Crassostrea gigas*" (1998)) y de *Bacillus subtilis* (US5,948,662 "Bacillus-derived transglutaminase" (1999)).

5           En los últimos años, el grupo de investigación autor de la presente invención ha realizado asimismo trabajos previos a nivel bioquímico, sobre la implicación de la TGasa en la morfogénesis de callos de maíz y su relación con la luz (Bernet, E., Claparols, I., Dondini, L., Santos, M.A., Serafini-Fracassini, D. & Torné, J.M<sup>a</sup>. 1999. Changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylases and  
10 transglutaminase activities during light/dark phases (of initial differentiation) in maize calluses and their chloroplast. Plant Physiol Biochem. 37(12): 899-909). Además, recientemente se ha publicado la inmunolocalización de este enzima en distintos sistemas celulares de maíz, en relación con el desarrollo de los cloroplastos (Villalobos, E., Torné, J.M., Ollés, C., Claparols, I. & Santos, M.A. 2001. Subcellular localization of  
15 a transglutaminase related to grana development in different maize cell types. Protoplasma. 216: 155-163). Sin embargo, no se han encontrado resultados sobre la identificación molecular y actividad funcional con transglutaminasas vegetales, por lo que es de alto interés comercial nuevos conocimientos sobre dichas transglutaminasas.

## 20   **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

### **Descripción breve**

La invención se enfrenta con el problema asociado con la escasez de TGAsas de origen vegetal necesarias en el campo de la manipulación y transformación de alimentos y en el desarrollo de plantas transgénicas con nuevas capacidades.

25           La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han identificado unas secuencias de ADN con actividad TGasa (TGasa; EC2.3.2.13) a partir del maíz. La actividad TGasa de las proteínas codificadas a partir de dichas secuencias de ADN se ha puesto de manifiesto en experimentos a partir de extractos de estas proteínas.

30           Por tanto, un objeto de esta invención lo constituyen dichas moléculas de ADN.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un vector que comprende, al menos, una de dichas moléculas de ADN.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dichas moléculas de ADN o de dichos vectores, para producir células transformadas capaces de expresar proteínas recombinantes con actividad TGasa, o para introducir dicha  
5 secuencia codificante de una proteína con actividad TGasa en células de plantas. Las células de microorganismos y las plantas transgénicas resultantes también constituyen objetos adicionales de esta invención.

Un objeto adicional de la presente invención lo constituye las proteínas con actividad TGasa expresadas a partir de dichas secuencias de ADN y su empleo en la  
10 manipulación y transformación de alimentos.

### Descripción Detallada de la invención

La invención proporciona una molécula de ADN, en adelante molécula de ADN de la invención, proveniente de plantas y codificante de una proteína con actividad  
15 TGasa que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3 o un fragmento de la misma; y
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia definida en a),

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir  
20 a cualquier secuencia de ADN que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. NO 1 ó a la SEQ ID NO 3, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o  
25 más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia.

En general, una molécula de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos identificada como la SEQ. ID. NO: 1 ó SEQ ID NO 3. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de  
30 nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

La molécula de ADN de la invención procede de maíz y puede encontrarse en formas parecidas en otras especies de plantas superiores, entre otras: arroz, trigo,

Arabidopsis, etc, donde pueden estar de forma natural o en otro caso, también podrían estar como resultado de un proceso de transformación génica en el que el organismo transformado reproduzca dichas moléculas de ADN. La molécula de ADN de la  
5 invención puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir del ADN de cualquier planta que la contenga, mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos, preparados gracias a la información de la secuencia de nucleótidos de dicha molécula de ADN, proporcionada en esta invención.

La molécula de ADN de la invención incluye los fragmentos de la misma que  
10 presentan dicha actividad GTasa.

En una realización particular, la molécula de ADN de la invención es una molécula de ADN de maíz de SEQ ID NO 1 ó de SEQ ID NO 3.

La molécula de ADN de la invención puede ser utilizada, en general, en la generación de un vector de expresión, en adelante vector de expresión de la invención,  
15 que permite la expresión de estas proteínas con actividad TGasa en una amplia gama de células huésped. En general, el vector de expresión de la presente invención comprende, al menos, una secuencia de ADN de la invención y, al menos, un promotor que dirige la transcripción del gen de interés, al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción del gen de interés y su regulación adecuada  
20 en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs),  
25 cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos o virus, que pueden contener, además, un origen bacteriano o de levadura de replicación para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Por tanto, la invención también se refiere a un vector  
30 que comprende una molécula de ADN de la invención. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido



que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma de la célula huésped.

El vector de la invención puede ser obtenido por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Kovesdi et al. 1997. Curr Opin Biotech 8:583-589 Transgenic Res. 10:83-103; Coffin et al. 1998. Retroviruses, CSHLP; Robbins et al. 1998. Trends Biotech. 16:35-40; Anderson. 1998. Nature 392:25-30; Schindelhauer. 1999. BioEssays 21:76-83). Un objeto particular de la presente invención lo constituye los plásmidos pGEMT15 y el pGEMT21 que contienen las SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 3, respectivamente.

La invención también proporciona una célula que comprende una molécula de ADN o vector de expresión de la invención. Las células hospedadoras que se pueden transformar con dicho vector de expresión pueden ser, por ejemplo, células bacterianas y levaduras GRAS. Estas células que contienen el vector de expresión de la presente invención pueden ser utilizadas para la sobreproducción de las proteínas con actividad TGasa codificadas por la molécula de ADN de la presente invención. Un objeto particular de la presente invención lo constituye una proteína con actividad TGasa, entre otras, con una secuencia de aminoácidos según se describe en la SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 4.

Estos resultados permiten abrir nuevas posibilidades de transformar un sistema bacteriano GRAS (Generally Recognized as Safe) o una levadura que serviría, a través de la expresión heteróloga, para producir las mencionadas nuevas proteínas TGasa. Como se ha indicado anteriormente una proteína con actividad TGasa puede ser utilizada en múltiples procesos de manipulación, procesamiento y transformación de alimentos gracias a su capacidad de crear uniones covalentes entre proteínas distintas. Esta propiedad se ha usado por ejemplo para mantener la textura de alimentos como pescado y carnes, reduciendo la necesidad de utilizar sales vease patente US5928689 "Method for treating PSE meat with transglutaminase", WO0162888 "Improved composition of marine product"; para la formulación de gelatinas de distinta densidad; para preparar cocinados con menos grasas (tofu) vease US 6342256 "Tofu products excellent in freeze resistance and process for producing the same", US6042851 "Process for producing packed tofu". También es capaz de mantener la consistencia, elasticidad, humedad o viscosidad de un producto en diferentes temperaturas. Se usa asimismo en

distintos procesados lácticos: quesos (US6270814 "Incorporation of whey into process cheese", solicitud US20010053398 "Cheese whey protein having improved texture process for producing the same and use thereof"), yogures, helados, mayonesas, salsas y en la producción de fideos (EP0948905 "Enzyme preparations comprising transglutaminase and process for producing noodles", US6106887 "Process for obtaining a modified cereal flour"), de chocolate (US6063408 "Process for producing chocolate"), de productos derivados a partir de patata (solicitud US20020004085 "Methods for producing potato products"), de azúcar (JP2000354498 "Production of sugar from cereal flour material by transglutaminase treatment"). Los distintos usos, entre otros, descritos en las patentes anteriores para las TGasas son ejemplos de los potenciales usos de las TGasas de la presente invención. Por lo tanto, un objeto particular de la presente invención es la utilización de las proteínas con actividad TGasa de la presente invención, entre otras, las proteínas SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 4, o soluciones que las contengan, en la manipulación, preparación y transformación de alimentos. A continuación se indica como ejemplo de las aplicaciones de las proteínas con actividad TGasa de la presente invención la revisión de Chiya Kuraishi et al, 2001 (Transglutaminase: Its utilization in the food industry Food Reviews International 17 (2): 221-246).

Finalmente, existen otras aplicaciones distintas de las comentadas anteriormente de las proteínas con actividad TGasa de la presente invención y de las que se indican como ilustración de dichas aplicaciones las siguientes patentes, entre otras:

- "Method for enzymatic treatment of wool" Patente USA. Appl. N° 161824 (1998) MacDevitt et al, April 2000.
- "Enzymatically protein encapsulating oil particles by complex coacervation" Appl. N° 791953 (1997). Soper, Jon C. Et al. March 2000.
- "Cross-linked gelatin gels and methods of making them" Appl. N° 641463 (1996) Bishop, P.D. et al. ZymoGenetics, Inc.(Seattle, WA. USA).
- "Process for obtaining a modified cereal flour" Appl. N° 977575 Ajinomoto Co. Inc (Tokyo JP). Yamazaki et al. August 2000.
- "Microbial transglutaminase, their production and use" Appl. N° 294565, (1999). NovoNordisk A/S (Bagsvaerd, DK) Bech et al. Feb. 2001.

Además, la molécula de ADN o vector de expresión de la invención pueden emplearse en procedimientos de transformación genética de plantas con finalidades tanto de investigación fundamental y en el desarrollo de plantas transgénicas con nuevas capacidades provocadas por la manipulación de las funciones atribuidas a dicha TGasa (crecimiento y desarrollo de la planta, morfogénesis, fotosíntesis y muerte celular) mediante la alteración de la expresión de dichas proteínas.

### DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

**Figura 1.-** Actividad TGasa (medida en pmol de Put incorporada) de un extracto proteico correspondiente a cada uno de los productos de lisis fágica descrito en el apartado de metodología, correspondientes a los fagos positivos f1 y f2 (que contienen un distinto cDNA de TGasa de maíz: f1= SEQ 1D NO 1 y f2= SEQ 1D NO 3) y al fago negativo f3 (que no contiene ningún cDNA de TGasa). Además, se muestra el efecto de distintos factores que influyen sobre la actividad TGasa de los extractos, descritos como propios de dicha actividad enzimática TGasa en otros sistemas: *Calcio*= el extracto proteico y en ausencia de calcio. *GTP*= adición de 1 mM de GTP. *MDC*= adición de 1 mM de MDC.

**Figura 2.-** Actividad de los dos extractos proteicos correspondientes a los dos fagos independientes que contienen los dos cDNA de la TGasa (f1= SEQ 1D N° 1; f2= SEQ 1D N° 2), frente a un fago que no contiene ninguno de estos cDNA (f3), con respecto a la cantidad de proteína del ensayo. La actividad se mide en miliunidades (mU) de TGasa, por incorporación de biotincadaverina, como se describe en el apartado de metodología.

a= 40 mg proteína/ml. b= 60 mg prot/ml. c= 80 mg prot./ml.

**EJEMPLOS DE LA INVENCION**

**Ejemplo 1.- Aislamiento y clonaje de dos cDNA que codifican para dos proteínas de la familia de transglutaminasas de maíz mediante inmunocribado.**

5 *Banco de expresión.*

Los cDNA de la presente invención, fueron aislados a partir de un banco de expresión de cDNA, en Lambda-ZAP II ®, construida con las dianas EcoRI y XhoI, partiendo de ARN mensajero de plántulas de dos semanas de edad de *Zea mays* subsp. *mays*, cultivar

10 Barkan, de la Universidad de Oregon, USA).

*Anticuerpo utilizado en el inmunocribado*

Se utilizó como antígeno una transglutaminasa vegetal de 58 kDa purificada a partir de extractos de cloroplastos de hojas de *Helianthus tuberosus*. Se obtuvo un anticuerpo policlonal en gallina (Villalobos, E., Torné, J.M., Ollés, C., Claparols, I. & Santos, M.A. 2001. Subcellular localization of a transglutaminase related to grana development in different maize cell types. Protoplasma. 216: 155-163). La especificidad del anticuerpo se determinó por la técnica de "dot blot", utilizando transglutaminasa comercial de hígado de cerdo, así como por western blot con proteína purificada (Dondini, L. 1998. Poliammine legate e transglutaminasi nelle piante. PhD tesis.

20 Universidad de Bolonia. Italia). La titulación se realizó mediante la técnica de western blot. (La metodología completa se detalla en nuestro trabajo: Villalobos, E., Torné, J.M., Ollés, C., Claparols, I. & Santos, M.A. 2001. Subcellular localization of a transglutaminase related to grana development in different maize cell types. Protoplasma. 216: 155-163).

25 *Inmunocribado del banco.*

Una vez conocido el título del banco utilizado, se inocula una colonia de la cepa XL-Blue® en medio LB líquido conteniendo MgSO<sub>4</sub> (1M) y maltosa al 20%.

Después de cultivar las bacterias hasta alcanzar una DO de 2,0 (600 nm), se realiza la mezcla del cultivo bacteriano con  $4,5 \times 10^4$  pfu de la librería, a la que se añade IPTG 10 mM. Después de la infección e inoculación en placas con el medio LB + 10 mM de MgSO<sub>4</sub>, se coloca sobre ellas un disco de nitrocelulosa saturado con 10 mM de IPTG. Después de incubar las placas con el filtro durante 4 horas, se enfrían y se lava el filtro con PBS. Finalmente, una vez bloqueada la membrana con leche desnatada o BSA, se

procede al revelado y marcado con anticuerpo. Para detectar las lisis donde se encuentran los fagos positivos que han de interaccionar con el anticuerpo contra la Transglutaminasa de *H. tuberosus*, se realiza un análisis western blot de dicha membrana y se revela en placa fotográfica, mediante el reactivo ECL.

*Excisión in vivo de los fagémidos en pBluescript SK- y selección de colonias positivas.*

Una vez aislados y purificados los dos fagos, que contienen los cDNAs que codifican respectivamente para una proteína que interacciona con el anticuerpo, se procede a su excisión mediante el sistema “ExAssist<sup>TM</sup> Interference-Resistant Helper Phage (Stratagene)”. La coinfección se realizó en cepas XL1-Blue y la infección en cepas XL0LR®. El plaqueo se realiza en un medio selectivo que determina el vector utilizado (pBluescript). En nuestro caso, el medio de cultivo que selecciona las colonias transformantes es LB-agar adicionado con Ampicilina (50 µg/ml), IPTG 1 mM y el sustrato X-Gal (40 µg/ml), del enzima β-galactosidasa, cuyo gen es interrumpido por el inserto o cDNA.

*Aislamiento de plásmidos a pequeña escala (MINIPREP).*

Para cada excisión, el aislamiento del ADN plasmídico, que contiene el cDNA de interés, se realiza mediante la técnica de MINIPREP a pequeña escala de la lisis bacteriana utilizando SDS y NaOH, neutralizada con acetato de potasio, y purificada con una mezcla de fenol:cloroformo:isoamil-alcohol (25:24:1) y precipitando con etanol. Posteriormente se resuspende en Tampón TE 1X adicionado con el enzima ARNasa.

*Comprobación de la presencia de cDNA en el vector pBluescript.*

En cada caso, la comprobación de la presencia del inserto en el pBluescript se realiza mediante digestiones de una muestra del ADN plasmídico, obtenido con las mismas enzimas endonucleasas con las que se construyó el banco (EcoRI y XhoI). La digestión se realiza según los requerimientos de cada enzima de restricción (Tampón y temperatura). Una vez realizada la digestión, el cDNA o inserto ha quedado liberado del vector. Esto se verifica con una electroforesis convencional en gel de agarosa 0.5 % en Tampón TBE 1X o TAE 1X.

*Secuenciación (Servicio de Secuenciación del IBMB, CSIC de Barcelona).*

Una vez identificadas las muestras de las minipreparaciones que contienen los cDNA de interés, que resultaron ser dos en nuestro caso, se precipitan y purifican mediante el uso

de la mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico y cloroformo puro antes del proceso de secuenciación. Las muestras a secuenciar se disolvieron en agua.

*Determinación de la secuencia codificante completa mediante la técnica de RACE*

5 Las excisiones de los dos fagos en pBluescript SK-, permitieron obtener dos cDNA parciales cuya secuencia codificante completa se definió mediante la técnica de RACE. Para ello, a partir de ARN total extraído de hoja de maíz, se obtiene el ARN mensajero purificado por columna de polydT, el cual se emplea como molde para la síntesis de ADN de cadena sencilla. Para ello, se utiliza un oligonucleótido específico deducido de la secuencia de cDNA conocida (el oligo E1, 3'-5': GATTCTCCCTGATAAG, SEQ ID NO 5) y el enzima transcriptasa inversa. Después de añadir al ADN de cadena sencilla una cola de poliT mediante el enzima "terminal deoxytransferase" (TdT), se procede a obtener la segunda cadena de ADN. Esto se realiza mediante la técnica de PCR utilizando el oligonucleótido 5' RACE Abridged Anchor Primer (GIBCO BRL®),  
10 específico para ADN con cola de poliT (oligo ANCHOR 5'-3': GGCCAGGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG, SEQ ID NO 6) y un segundo oligonucleótido específico del cDNA parcial de secuencia conocida, detallado anteriormente, y que corresponde al oligo E2 3'-5': GTTCTCCAGCATCTCCAG, SEQ ID NO 7).

20 Con los subsiguientes ciclos de PCR se amplifica dicho ADN. La secuencia de los ciclos fue la siguiente: primero 2 minutos a 94°C y seguidamente 34 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 46 °C para el oligo n°1, pero 30 segundos a 60 °C para el oligo n°2, seguidos en ambos casos de 7 minutos a 72 °C. Finalmente se deja unas horas a 5 °C.

25 El producto de PCR se clona en un vector adecuado (como es el pGEMT), utilizando el enzima ligasa. A continuación, se transforman cepas de *E. coli* del tipo DH5-alfa y se crecen las bacterias en un medio selectivo. Se extrae el ADN plasmídico mediante la técnica de Miniprep, ya descrita, se purifica y se secuenciar el fragmento obtenido. En nuestro caso, para ambas secuencias parciales de cDNA, el fragmento  
30 necesario para completar la secuencia codificante resultó ser de solo cuatro nucleótidos. Las secuencias codificantes completas de nucleótidos, incluyendo los cuatro nucleótidos obtenidos con la técnica RACE, se encuentran descritas en la SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 3, respectivamente. Los vectores de expresión conteniendo las secuencias SEQ ID

NO 1 y SEQ ID NO 3 y utilizados para la transformación de las células huésped son el plásmido pGEMT15 y el pGEMT21, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de las secuencias de nucleótidos presentan homologías con los dominios del centro activo tipo transglutaminasa de otros sistemas descritos, no vegetales, en la zona correspondiente a los aminoácidos: 431-474 para la proteína de SEQ ID NO 2 (60,97 kDa) y 485-528 para la proteína de SEQ ID NO 4 (67 kDa). En estas zonas se encuentra en ambos casos una cisteína (Cys) descrita como aminoácido esencial para la actividad del enzima (Cys439 en SEQ ID NO 2 y Cys493 en SEQ ID NO 4). Base de Datos consultada: [www.ncbi.nlm.nih/](http://www.ncbi.nlm.nih/)). Además, como se indican en las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 3 se observan unas regiones de 27 nucleótidos repetidas en tandem en ambas secuencias, SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 3, aunque en número distinto, de 15 y 21 repeticiones, respectivamente y con pequeñas variaciones de nucleótidos entre algunas de ellas. Hay que destacar que estas mencionadas regiones repetidas no se han descrito anteriormente en las TGasas conocidas, por lo que son características de la molécula de ADN de la presente invención.

**Ejemplo 2.- Comprobación de la actividad transglutaminasa de las proteínas expresadas por dichos cDNA.**

*20 Determinación de la actividad TGasa de la proteína expresada por el cDNA.*

Con cada uno de los dos clones de los fagos conteniendo los cDNA de interés, se infecta un cultivo de *E. coli* (cepa XL-Blue), en medio de cultivo LB líquido, al que se añade IPTG 10 mM. Después de la lisis a 37°C, se cuantifica por el método de Lowry la concentración de proteína total del extracto (Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr, AL& Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol. Chem. 193:265-275) y con él se realizan los ensayos descritos a continuación, para determinar su actividad transglutaminasa frente a un extracto de lisis con un fago que no contiene el cDNA de interés.

*30 1.- Método de detección de actividad TGasa mediante determinación de las proteínas marcadas con putrescina tritiada.*

Se prepara un extracto enzimático con cada uno de los extractos de lisis obtenidos con ambos fagos (f1 que contiene la TGasa de SEQ ID NO 2 y f2 que contiene la TGasa de SQ ID NO 4), en una concentración de proteínas totales de 600

μg, y se realiza un ensayo enzimático a 30°C durante 30 minutos. La mezcla enzimática contiene, además del extracto proteico, 0.6 mM de putrescina, 185 kBq de putrescina tritiada (0.85 TBq/nmol), 20 mM de tampón Tris.ClH pH 8 y 3 mM de CaCl<sub>2</sub>. La  
5 reacción se bloquea con ácido tricloracético al 10% conteniendo 2 mM de putrescina. Las muestras se precipitan repetidamente y se mide la radioactividad del pellet (Bernet, E., Claparols, I., Dondini, L., Santos, M.A., Serafini-Fracassini, D. & Torné, J.M<sup>a</sup>. 1999). Changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylases and transglutaminase activities during light/dark phases (of initial differentiation) in maize  
10 calluses and their chloroplast. Plant Physiol Biochem. 37(12): 899-909). La actividad TGasa se mide en pmols de putrescina por miligramo de proteína y por hora y fue mayor en los extratos proteicos obtenidos de los fagos f1 y f2 con respecto al extracto a partir de un fago que no contiene ninguno de los cDNA de estas TGasa.

2. *Método de detección de la actividad TGasa mediante ensayo tipo Elisa,*  
15 *utilizando CBZ-Gln-Gly como primer sustrato y biotincadaverina como segundo.*

Este ensayo consiste en un kit suministrado por la empresa Covalab®, que determina, a partir de pequeñas cantidades de proteína total, la actividad TGasa de la muestra, frente a la de una TGasa comercial de hígado de cerdo. El método detecta los glutamil-derivados formados a partir del péptido y de la poliamina sustrato, por  
20 actividad TGasa de la muestra, mediante un ensayo colorimétrico. La actividad se mide en Unidades de TGasa (U), considerando que 0.6 mU de TGasa comercial corresponde a un valor de absorbancia a 450 nm de  $1 \pm 0.05$  OD.

Los dos extractos proteicos correspondientes a los dos productos de lisis, muestran actividad tipo TGasa en los dos métodos de detección de dicha actividad  
25 utilizados y descritos anteriormente (f1 y f2) en comparación con el extracto proveniente de un fago que no contiene ninguno de estos cDNA (f3). Los datos se muestran en las Figuras 1 y 2.

Además, en la Figura 1 se muestra el efecto de distintos factores sobre la actividad TGasa de los extractos, descritos como propios de dicha actividad enzimática  
30 TGasa en otros sistemas. Así, la actividad de la proteína expresada disminuye significativamente: a] en ausencia de calcio, b] en presencia de 1 mM de GTP, c] en presencia de 1 mM denodansilcadaverina (MDC) y d] en el extracto de lisis con un fago que no posee el cDNA de interés (f3).

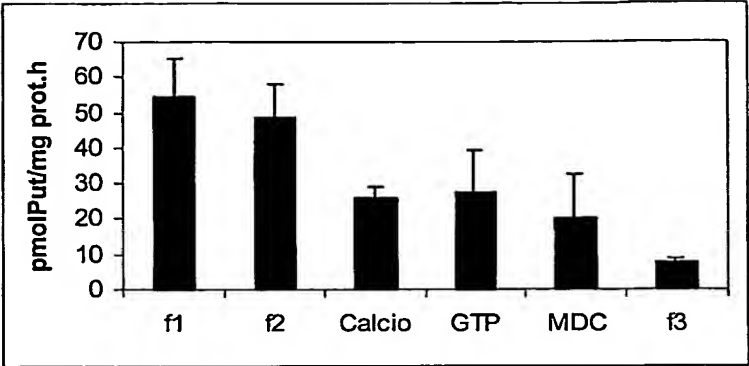


Un par cultivos de la bacteria derivada de *Escherichia coli*, tipo dH5 $\alpha$ , transformadas con un plásmido (pBlueScript) que contiene un cDNA de maíz y portadoras de un plásmido que contiene el gen que codifica la proteína de secuencia  
5 SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 4 de maíz respectivamente, identificados como 15TGZM02 y 21TGZM02, han sido depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100 Burjasot, Valencia, España, el ¿7? de Mayo de 2002, correspondiéndoles el  
10 número de depósito CECT: 5705 para 15TGZM02 y 5706 para 21TGZM02, respectivamente.

**REIVINDICACIONES**

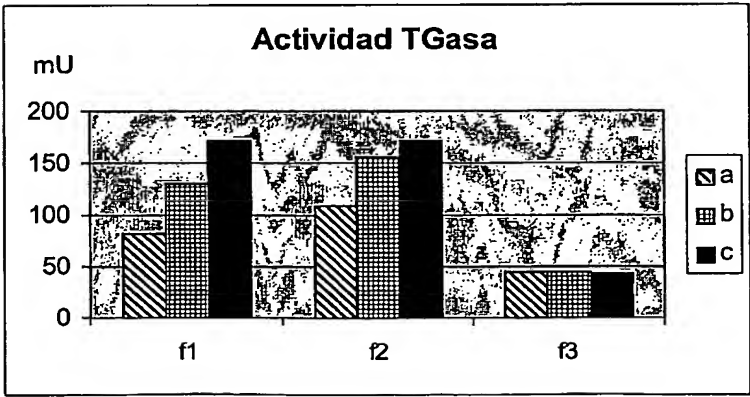
- 1.- Secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad TGasa caracterizada porque proviene del maíz.
- 5 2.- Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 caracterizada por la SEQ ID NO 1.
- 3.- Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 caracterizada por la SEQ ID NO 3
- 4.- Secuencia de nucleótidos caracterizada porque presenta, con respecto a una  
10 secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3, un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.y porque codifica una proteína con actividad Tgasa.
- 5.- Vector de expresión caracterizado porque contiene una secuencia de nucleótidos  
15 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4.
- 6.- Vector de expresión según la reivindicación 5 caracterizado porque pertenece, entre otros, al siguiente grupo: plásmido pGEMT15 y el pGEMT21.
- 7.- Proteína con actividad TGasa caracterizada porque está codificada por una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4.
- 20 8.- Proteína con actividad TGasa según la reivindicación 7 caracterizada porque pertenece, entre otras, al siguiente grupo: SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 4.
- 9.- Célula transformada caracterizada porque contiene un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6 y porque permite la expresión de proteínas con actividad TGasa, entre otras, las cepas *E. coli* CECT 5705 y 5706.
- 25 10.- Uso de la célula transformada según la reivindicación 9 en procedimientos para la producción de proteína recombinante con actividad TGasa según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8.
- 11.- Uso de la proteína con actividad TGasa según una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8 en la manipulación, procesamiento y transformación de  
30 alimentos, entre otros procesos, para mantener o mejorar la textura, consistencia, elasticidad, humedad o viscosidad de alimentos como pescado, queso, yogures, helados, mayonesas y carnes, para la formulación de gelatinas de distinta densidad y para preparar cocinados con menos grasas.

- 12.- Uso de los vectores de expresión según las reivindicaciones 5 y 6 en el desarrollo de plantas transgénicas con nuevas capacidades provocadas por la manipulación de las funciones atribuidas a dicha TGasa, entre otras, crecimiento y desarrollo de la planta,
- 5 morfogénesis, fotosíntesis y muerte celular.



5

Figura 1



10

Figura 2

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS  
Torné Cubiró, José María  
5 Santos Lozano, María Asunción  
Talavera Baro, David  
Villalobos Amador, Enrique  
Rigau Lloveras, Juan
- 10 <120> SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DE MAIZ CODIFICANTE DE UNA PROTEINA CON  
ACTIVIDAD TRANSGLUTAMINASA, Y SU USO
- <130> transglutaminasa de maiz
- 15 <160> 4
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1  
20 <211> 1748  
<212> DNA  
<213> Zea mays L
- <220>  
25 <221> repeat\_region  
<222> (823)..(1228)  
<223> rpt unit (823).. (849) number rpt: 15 repeats
- <220>  
30 <221> 3'UTR  
<222> (1606)..(1729)  
<223>
- <220>  
35 <221> polyA\_site  
<222> (1730)..(1748)  
<223>
- <220>  
40 <221> polyA\_site

<222> (1730) .. (1748)

<223>

**<220>**

5 <221> CDS

<222> (1) .. (1605)

<223>

**<300>**

10 <308> AJ421525

<309> 2001-12-06 confidencial hasta el 2002-12-06

<400> 1

	atg gct cat cgt gga cat cta gat gga ctg act ggc caa gct cct gct	48
15	Met Ala His Arg Gly His Leu Asp Gly Leu Thr Gly Gln Ala Pro Ala	
	1 5 10 15	
	ctt atg cgc cat ggt tcc ttc gct gca ggc agc ctc tct agc cgc tca	96
	Leu Met Arg His Gly Ser Phe Ala Ala Gly Ser Leu Ser Ser Arg Ser	
	20 25 30	
20	cct ttg cag tct tca tcc aca ctg gag atg ctg gag aac aag ctt gcc	144
	Pro Leu Gln Ser Ser Ser Thr Leu Glu Met Leu Glu Asn Lys Leu Ala	
	35 40 45	
	atg caa act aca gaa gtg gaa aag ctt atc acg gag aat cag cgg tta	192
	Met Gln Thr Thr Glu Val Glu Lys Leu Ile Thr Glu Asn Gln Arg Leu	
25	50 55 60	
	gca tca agc cat gtg gtc ttg agg cag gac att gtt gat acg gag aaa	240
	Ala Ser Ser His Val Val Leu Arg Gln Asp Ile Val Asp Thr Glu Lys	
	65 70 75 80	
	gag atg caa atg atc cgc acc cac cta ggt gaa gtt cag aca gag act	288
30	Glu Met Gln Met Ile Arg Thr His Leu Gly Glu Val Gln Thr Glu Thr	
	85 90 95	
	gat ttg cag att aga gat ttg ttg gag aga atc aga tta atg gag gta	336
	Asp Leu Gln Ile Arg Asp Leu Leu Glu Arg Ile Arg Leu Met Glu Val	
	100 105 110	
35	gat ata cat agt ggt aat gta gtg aac aag gag ctt cac caa atg cat	384
	Asp Ile His Ser Gly Asn Val Val Asn Lys Glu Leu His Gln Met His	
	115 120 125	
	atg gag gca aag aga ctt att act gaa agg cag atg cta acc ctt gag	432
	Met Glu Ala Lys Arg Leu Ile Thr Glu Arg Gln Met Leu Thr Leu Glu	
40	130 135 140	

## 3

	ata gag gat gtg act aaa gaa tta cag aaa ctc tct gcc tct ggg gac	480
	Ile Glu Asp Val Thr Lys Glu Leu Gln Lys Leu Ser Ala Ser Gly Asp	
	145 150 155 160	
	aat aaa agc ctt cct gaa ttg ctt tct gag cta gat agg cta cgg aaa	528
5	Asn Lys Ser Leu Pro Glu Leu Leu Ser Glu Leu Asp Arg Leu Arg Lys	
	165 170 175	
	gag cat cat aat tta cga tct cag ttt gaa ttt gag aaa aat aca aac	576
	Glu His His Asn Leu Arg Ser Gln Phe Glu Phe Glu Lys Asn Thr Asn	
	180 185 190	
10	gtc aag caa gtt gag cag atg cgg aca atg gaa atg aac ttg ata acc	624
	Val Lys Gln Val Glu Gln Met Arg Thr Met Glu Met Asn Leu Ile Thr	
	195 200 205	
	atg acc aaa caa gct gag aag tta cgt gtt gat gtg gca aat gct gaa	672
	Met Thr Lys Gln Ala Glu Lys Leu Arg Val Asp Val Ala Asn Ala Glu	
15	210 215 220	
	aga cgg gca caa gca gct gcg gct caa gca gca gca cat gca gct ggt	720
	Arg Arg Ala Gln Ala Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala His Ala Ala Gly	
	225 230 235 240	
	gca cag gtg aca gct tcg cag cct gga cag ctc aag cta cca cgg ttt	768
20	Ala Gln Val Thr Ala Ser Gln Pro Gly Gln Leu Lys Leu Pro Arg Phe	
	245 250 255	
	cag cag cag cag cca cag act cat atg cag gtg cat ata cca gct acc	816
	Gln Gln Gln Gln Pro Gln Thr His Met Gln Val His Ile Pro Ala Thr	
	260 265 270	
25	ccc ctg cat atc agc agg gag ccc agg ctg ggg cat atc agc agg gtg	864
	Pro Leu His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Val	
	275 280 285	
	ctc agg ctg ggg tat atc agc agg gag ccc agg ctg ggg cat atc agc	912
	Leu Arg Leu Gly Tyr Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser	
30	290 295 300	
	agg gag ccc agg ctg ggg cat atc agc agg ggg gcc agg atg ggg cat	960
	Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Gly Ala Arg Met Gly His	
	305 310 315 320	
	atc agc agg ggg ctc agg ctg ggg cat atc agc agg gag ccc agg ctg	1008
35	Ile Ser Arg Gly Leu Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu	
	325 330 335	
	ggg cat atc agc agg gag ccc agg ctg ggg cat atc agc agg gtg ctc	1056
	Gly His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Val Leu	
	340 345 350	
40	agg ctg ggg cat atc agc agg gag ccc agg ctg ggg cat atc agc agg	1104

## 4

Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg  
 355 360 365  
 ggg ccc agt ctg ggg cat atc agc agg ggg ccc agg ctg ggg cat atc 1152  
 Gly Pro Ser Leu Gly His Ile Ser Arg Gly Pro Arg Leu Gly His Ile  
 5 370 375 380  
 agc agg gag ccc agg atg ggg cat atc agc agg gag ccc agg atg ggg 1200  
 Ser Arg Glu Pro Arg Met Gly His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Met Gly  
 385 390 395 400  
 cat atc agc agg gtg ctc agg ctg gag cat aca act atg ctt atg atg 1248  
 10 His Ile Ser Arg Val Leu Arg Leu Glu His Thr Thr Met Leu Met Met  
 405 410 415  
 ctg gca cgg ctt atg cat atg cag gtt act ctg gct atc cag ttg cag 1296  
 Leu Ala Arg Leu Met His Met Gln Val Thr Leu Ala Ile Gln Leu Gln  
 420 425 430  
 15 gct acg cgc aaa gtg cag tgc cca act att cct atg ctg cac ctc cgc 1344  
 Ala Thr Arg Lys Val Gln Cys Pro Thr Ile Pro Met Leu His Leu Arg  
 435 440 445  
 agc caa caa gca gcg gtg cag cta cga acg ccg cag gag gcc agt atg 1392  
 Ser Gln Gln Ala Ala Val Gln Leu Arg Thr Pro Gln Glu Ala Ser Met  
 20 450 455 460  
 ggg cag ttg gta gtg ctg gat atc cta ctg ggc aag ttc agc cga gca 1440  
 Gly Gln Leu Val Val Leu Asp Ile Leu Leu Gly Lys Phe Ser Arg Ala  
 465 470 475 480  
 gtg gca ctg caa atg cag cgc aag cac ctc ctc ctc cac cac cac cgg 1488  
 25 Val Ala Leu Gln Met Gln Arg Lys His Leu Leu Leu His His His Arg  
 485 490 495  
 cag cac cat atc ccc cca gca cat atg acc aaa cca gag gag ccc aga 1536  
 Gln His His Ile Pro Pro Ala His Met Thr Lys Pro Glu Glu Pro Arg  
 500 505 510  
 30 gat aaa atc tgg gat gta aac cag atg gat gtt tgc cat gca cat ttg 1584  
 Asp Lys Ile Trp Asp Val Asn Gln Met Asp Val Cys His Ala His Leu  
 515 520 525  
 ttg agc aga caa ata tgg tga aatctgggat gtaaaaccag atggctgtct 1635  
 Leu Ser Arg Gln Ile Trp  
 35 530  
 gtgcctccat cccattgact agggcgtatt ttcaccaata ttgtgcctcc agtgcaattt 1695  
 cttctgtgtt atatatcacc accatttgtt gagcaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1748

&lt;210&gt; 2

40 &lt;211&gt; 534



5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Zea mays L

&lt;400&gt; 2

5 Met Ala His Arg Gly His Leu Asp Gly Leu Thr Gly Gln Ala Pro Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Met Arg His Gly Ser Phe Ala Ala Gly Ser Leu Ser Ser Arg Ser  
 20 25 30  
 Pro Leu Gln Ser Ser Ser Thr Leu Glu Met Leu Glu Asn Lys Leu Ala  
 10 35 40 45  
 Met Gln Thr Thr Glu Val Glu Lys Leu Ile Thr Glu Asn Gln Arg Leu  
 50 55 60  
 Ala Ser Ser His Val Val Leu Arg Gln Asp Ile Val Asp Thr Glu Lys  
 65 70 75 80  
 15 Glu Met Gln Met Ile Arg Thr His Leu Gly Glu Val Gln Thr Glu Thr  
 85 90 95  
 Asp Leu Gln Ile Arg Asp Leu Leu Glu Arg Ile Arg Leu Met Glu Val  
 100 105 110  
 Asp Ile His Ser Gly Asn Val Val Asn Lys Glu Leu His Gln Met His  
 20 115 120 125  
 Met Glu Ala Lys Arg Leu Ile Thr Glu Arg Gln Met Leu Thr Leu Glu  
 130 135 140  
 Ile Glu Asp Val Thr Lys Glu Leu Gln Lys Leu Ser Ala Ser Gly Asp  
 145 150 155 160  
 25 Asn Lys Ser Leu Pro Glu Leu Leu Ser Glu Leu Asp Arg Leu Arg Lys  
 165 170 175  
 Glu His His Asn Leu Arg Ser Gln Phe Glu Phe Glu Lys Asn Thr Asn  
 180 185 190  
 Val Lys Gln Val Glu Gln Met Arg Thr Met Glu Met Asn Leu Ile Thr  
 30 195 200 205  
 Met Thr Lys Gln Ala Glu Lys Leu Arg Val Asp Val Ala Asn Ala Glu  
 210 215 220  
 Arg Arg Ala Gln Ala Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala His Ala Ala Gly  
 225 230 235 240  
 35 Ala Gln Val Thr Ala Ser Gln Pro Gly Gln Leu Lys Leu Pro Arg Phe  
 245 250 255  
 Gln Gln Gln Gln Pro Gln Thr His Met Gln Val His Ile Pro Ala Thr  
 260 265 270  
 Pro Leu His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Val  
 40 275 280 285

## 6

Leu Arg Leu Gly Tyr Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser  
 290 295 300  
 Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Gly Ala Arg Met Gly His  
 305 310 315 320  
 5 Ile Ser Arg Gly Leu Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu  
 325 330 335  
 Gly His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Val Leu  
 340 345 350  
 Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg  
 10 355 360 365  
 Gly Pro Ser Leu Gly His Ile Ser Arg Gly Pro Arg Leu Gly His Ile  
 370 375 380  
 Ser Arg Glu Pro Arg Met Gly His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Met Gly  
 385 390 395 400  
 15 His Ile Ser Arg Val Leu Arg Leu Glu His Thr Thr Met Leu Met Met  
 405 410 415  
 Leu Ala Arg Leu Met His Met Gln Val Thr Leu Ala Ile Gln Leu Gln  
 420 425 430  
 Ala Thr Arg Lys Val Gln Cys Pro Thr Ile Pro Met Leu His Leu Arg  
 20 435 440 445  
 Ser Gln Gln Ala Ala Val Gln Leu Arg Thr Pro Gln Glu Ala Ser Met  
 450 455 460  
 Gly Gln Leu Val Val Leu Asp Ile Leu Leu Gly Lys Phe Ser Arg Ala  
 465 470 475 480  
 25 Val Ala Leu Gln Met Gln Arg Lys His Leu Leu Leu His His His Arg  
 485 490 495  
 Gln His His Ile Pro Pro Ala His Met Thr Lys Pro Glu Glu Pro Arg  
 500 505 510  
 Asp Lys Ile Trp Asp Val Asn Gln Met Asp Val Cys His Ala His Leu  
 30 515 520 525  
 Leu Ser Arg Gln Ile Trp  
 530  
  
 <210> 3  
 35 <211> 1910  
 <212> DNA  
 <213> Zea mays L  
  
 <220>  
 40 <221> repeat\_region

<222> (823)..(1389)  
 <223> rpt unit (823).. (849) number rpt: 21 repeats  
  
 <220>  
 5 <221> CDS  
 <222> (1)..(1764)  
 <223>  
  
 <220>  
 10 <221> polyA\_site  
 <222> (1892)..(1910)  
 <223>  
  
 <220>  
 15 <221> 3'UTR  
 <222> (1765)..(1891)  
 <223>  
  
 <400> 3  
 20 atg gct cat cgt gga cat cta gat gga ctg act ggc caa gct cct gct 48  
 Met Ala His Arg Gly His Leu Asp Gly Leu Thr Gly Gln Ala Pro Ala  
 1 5 10 15  
 ctt atg cgc cat ggt tcc ttc gct gca ggc agc ctc tct agc cgc tca 96  
 Leu Met Arg His Gly Ser Phe Ala Ala Gly Ser Leu Ser Ser Arg Ser  
 25 20 25 30  
 cct ttg cag tct tca tcc aca ctg gag atg ctg gag aac aag ctt gcc 144  
 Pro Leu Gln Ser Ser Ser Thr Leu Glu Met Leu Glu Asn Lys Leu Ala  
 35 40 45  
 atg caa act aca gaa gtg gaa aag ctt atc acg gag aat cag cgg tta 192  
 30 Met Gln Thr Thr Glu Val Glu Lys Leu Ile Thr Glu Asn Gln Arg Leu  
 50 55 60  
 gca tca agc cat gtg gtc ttg agg cag gac att gtt gat acg gag aaa 240  
 Ala Ser Ser His Val Val Leu Arg Gln Asp Ile Val Asp Thr Glu Lys  
 65 70 75 80  
 35 gag atg caa atg atc cgc acc cac cta ggt gaa gtt cag aca gag act 288  
 Glu Met Gln Met Ile Arg Thr His Leu Gly Glu Val Gln Thr Glu Thr  
 85 90 95  
 gat ttg cag att aga gat ttg ttg gag aga atc aga tta atg gag gta 336  
 Asp Leu Gln Ile Arg Asp Leu Leu Glu Arg Ile Arg Leu Met Glu Val  
 40 100 105 110

	gat ata cat agt ggt aat gta gtg aac aag gag ctt cac caa atg cat	384
	Asp Ile His Ser Gly Asn Val Val Asn Lys Glu Leu His Gln Met His	
	115 120 125	
	atg gag gca aag aga ctt att act gaa agg cag atg cta acc ctt gag	432
5	Met Glu Ala Lys Arg Leu Ile Thr Glu Arg Gln Met Leu Thr Leu Glu	
	130 135 140	
	ata gag gat gtg act aaa gaa tta cag aaa ctc tct gcc tct ggg gac	480
	Ile Glu Asp Val Thr Lys Glu Leu Gln Lys Leu Ser Ala Ser Gly Asp	
	145 150 155 160	
10	aat aaa agc ctt cct gaa ttg ctt tct gag cta gat agg cta cgg aaa	528
	Asn Lys Ser Leu Pro Glu Leu Leu Ser Glu Leu Asp Arg Leu Arg Lys	
	165 170 175	
	gag cat cat aat tta cga tct cag ttt gaa ttt gag aaa aat aca aac	576
	Glu His His Asn Leu Arg Ser Gln Phe Glu Phe Glu Lys Asn Thr Asn	
15	180 185 190	
	gtc aag caa gtt gag cag atg cgg aca atg gaa atg aac ttg ata acc	624
	Val Lys Gln Val Glu Gln Met Arg Thr Met Glu Met Asn Leu Ile Thr	
	195 200 205	
	atg acc aaa caa gct gag aag tta cgt gtt gat gtg gca aat gct gaa	672
20	Met Thr Lys Gln Ala Glu Lys Leu Arg Val Asp Val Ala Asn Ala Glu	
	210 215 220	
	aga cgg gca caa gca gct gcg gct caa gca gca gca cat gca gct ggt	720
	Arg Arg Ala Gln Ala Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala His Ala Ala Gly	
	225 230 235 240	
25	gca cag gtg aca gct tcg cag cct gga cag ctc aag cta cca cgg ttt	768
	Ala Gln Val Thr Ala Ser Gln Pro Gly Gln Leu Lys Leu Pro Arg Phe	
	245 250 255	
	cag cag cag cag cca cag act cat atg cag gtg cat ata cca gct acc	816
	Gln Gln Gln Gln Pro Gln Thr His Met Gln Val His Ile Pro Ala Thr	
30	260 265 270	
	ccc ctg cat atc agc agg gag ccc agg ctg ggg cat atc agc agg gtg	864
	Pro Leu His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Val	
	275 280 285	
	ctc agg ctg ggg tat atc agc agg gag ccc agg ctg ggg cat atc agc	912
35	Leu Arg Leu Gly Tyr Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser	
	290 295 300	
	agg gag ccc agg ctg ggg cat atc agc agg ggg gcc agg atg ggg cat	960
	Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Gly Ala Arg Met Gly His	
	305 310 315 320	
40	atc agc agg ggg ctc agg ctg ggg cat atc agc agg gag ccc agg ctg	1008

	Ile Ser Arg Gly Leu Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu	
	325 330 335	
	ggg cat atc agc agg gag ccc agg ctg ggg cat atc agc agg gtg ctc	1056
	Gly His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Val Leu	
5	340 345 350	
	agg ctg ggg cat atc agc agg gtg ctc agg ctg ggg tat atc agc agg	1104
	Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Val Leu Arg Leu Gly Tyr Ile Ser Arg	
	355 360 365	
	gaa ccc agg ctg ggg cat atc agc agg gag ccc agg ctg ggg cat atc	1152
10	Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile	
	370 375 380	
	agc agg ggg gcc agg atg ggg cat atc agc agg ggg ctc agg ctg ggg	1200
	Ser Arg Gly Ala Arg Met Gly His Ile Ser Arg Gly Leu Arg Leu Gly	
	385 390 395 400	
15	cat atc agc agg gag ccc agg ctg ggg cat atc agc agg gag ccc agg	1248
	His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Glu Pro Arg	
	405 410 415	
	ctg ggg cat atc agc agg ggg ccc agt ctg ggg cat atc agc agg ggg	1296
	Leu Gly His Ile Ser Arg Gly Pro Ser Leu Gly His Ile Ser Arg Gly	
20	420 425 430	
	ccc agg ctg ggg cat atc agc agg gag ccc agg atg ggg cat atc agc	1344
	Pro Arg Leu Gly His Ile Ser Arg Glu Pro Arg Met Gly His Ile Ser	
	435 440 445	
	agg gag ccc agg atg ggg cat atc agc agg gtg ctc agg ctg gag cat	1392
25	Arg Glu Pro Arg Met Gly His Ile Ser Arg Val Leu Arg Leu Glu His	
	450 455 460	
	aca act atg ctt atg atg ctg gca cgg ctt atg cat atg cag gtt act	1440
	Thr Thr Met Leu Met Met Leu Ala Arg Leu Met His Met Gln Val Thr	
	465 470 475 480	
30	ctg gct atc cag ttg cag gct acg cgc aaa gtg cag tgc cca act att	1488
	Leu Ala Ile Gln Leu Gln Ala Thr Arg Lys Val Gln Cys Pro Thr Ile	
	485 490 495	
	cct atg ctg cac ctc cgc agc caa caa gca gcg gtg cag cta cga acg	1536
	Pro Met Leu His Leu Arg Ser Gln Gln Ala Ala Val Gln Leu Arg Thr	
35	500 505 510	
	ccg cag gag gcc agt atg ggg cag ttg gta gtg ctg gat atc cta ctg	1584
	Pro Gln Glu Ala Ser Met Gly Gln Leu Val Val Leu Asp Ile Leu Leu	
	515 520 525	
	ggc aag ttc agc cga gca gtg gca ctg caa atg cag cgc aag cac ctc	1632
40	Gly Lys Phe Ser Arg Ala Val Ala Leu Gln Met Gln Arg Lys His Leu	

## 10

530 535 540  
 ctc ctc cac cac cac cgg cag cac cat atc ccc cca gca cat atg acc 1680  
 Leu Leu His His His Arg Gln His His Ile Pro Pro Ala His Met Thr  
 545 550 555 560  
 5 aaa cca gag gag ccc aga gat aaa atc tgg gat gta aac cag atg gat 1728  
 Lys Pro Glu Glu Pro Arg Asp Lys Ile Trp Asp Val Asn Gln Met Asp  
 565 570 575  
 gtt tgc cat gca cat ttg ttg agc aga caa ata tgg tgaaatctgg 1774  
 Val Cys His Ala His Leu Leu Ser Arg Gln Ile Trp  
 10 580 585  
 gatgtaaaac cagatggctg tctgtgcctc catcccattg actagggcgt attttcacca 1834  
 atattgtgcc tccagtgcaa tttcttctgt gttatatatc accaccattt gttggggcaaa 1894  
 aaaaaaaaaa aaaaaa 1910  
  
 15 <210> 4  
 <211> 588  
 <212> PRT  
 <213> Zea mays L  
  
 20 <400> 4  
 Met Ala His Arg Gly His Leu Asp Gly Leu Thr Gly Gln Ala Pro Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Met Arg His Gly Ser Phe Ala Ala Gly Ser Leu Ser Ser Arg Ser  
 20 25 30  
 25 Pro Leu Gln Ser Ser Ser Thr Leu Glu Met Leu Glu Asn Lys Leu Ala  
 35 40 45  
 Met Gln Thr Thr Glu Val Glu Lys Leu Ile Thr Glu Asn Gln Arg Leu  
 50 55 60  
 Ala Ser Ser His Val Val Leu Arg Gln Asp Ile Val Asp Thr Glu Lys  
 30 65 70 75 80  
 Glu Met Gln Met Ile Arg Thr His Leu Gly Glu Val Gln Thr Glu Thr  
 85 90 95  
 Asp Leu Gln Ile Arg Asp Leu Leu Glu Arg Ile Arg Leu Met Glu Val  
 100 105 110  
 35 Asp Ile His Ser Gly Asn Val Val Asn Lys Glu Leu His Gln Met His  
 115 120 125  
 Met Glu Ala Lys Arg Leu Ile Thr Glu Arg Gln Met Leu Thr Leu Glu  
 130 135 140  
 Ile Glu Asp Val Thr Lys Glu Leu Gln Lys Leu Ser Ala Ser Gly Asp  
 40 145 150 155 160

11

	Asn	Lys	Ser	Leu	Pro	Glu	Leu	Leu	Ser	Glu	Leu	Asp	Arg	Leu	Arg	Lys
					165					170					175	
	Glu	His	His	Asn	Leu	Arg	Ser	Gln	Phe	Glu	Phe	Glu	Lys	Asn	Thr	Asn
				180					185					190		
5	Val	Lys	Gln	Val	Glu	Gln	Met	Arg	Thr	Met	Glu	Met	Asn	Leu	Ile	Thr
			195					200					205			
	Met	Thr	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Leu	Arg	Val	Asp	Val	Ala	Asn	Ala	Glu
		210					215					220				
	Arg	Arg	Ala	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Gln	Ala	Ala	Ala	His	Ala	Ala	Gly
10	225					230					235					240
	Ala	Gln	Val	Thr	Ala	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Leu	Lys	Leu	Pro	Arg	Phe
				245						250					255	
	Gln	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Thr	His	Met	Gln	Val	His	Ile	Pro	Ala	Thr
				260					265					270		
15	Pro	Leu	His	Ile	Ser	Arg	Glu	Pro	Arg	Leu	Gly	His	Ile	Ser	Arg	Val
			275					280					285			
	Leu	Arg	Leu	Gly	Tyr	Ile	Ser	Arg	Glu	Pro	Arg	Leu	Gly	His	Ile	Ser
		290					295					300				
	Arg	Glu	Pro	Arg	Leu	Gly	His	Ile	Ser	Arg	Gly	Ala	Arg	Met	Gly	His
20	305					310					315					320
	Ile	Ser	Arg	Gly	Leu	Arg	Leu	Gly	His	Ile	Ser	Arg	Glu	Pro	Arg	Leu
				325					330					335		
	Gly	His	Ile	Ser	Arg	Glu	Pro	Arg	Leu	Gly	His	Ile	Ser	Arg	Val	Leu
			340						345					350		
25	Arg	Leu	Gly	His	Ile	Ser	Arg	Val	Leu	Arg	Leu	Gly	Tyr	Ile	Ser	Arg
		355						360					365			
	Glu	Pro	Arg	Leu	Gly	His	Ile	Ser	Arg	Glu	Pro	Arg	Leu	Gly	His	Ile
		370					375					380				
	Ser	Arg	Gly	Ala	Arg	Met	Gly	His	Ile	Ser	Arg	Gly	Leu	Arg	Leu	Gly
30	385					390					395					400
	His	Ile	Ser	Arg	Glu	Pro	Arg	Leu	Gly	His	Ile	Ser	Arg	Glu	Pro	Arg
				405					410					415		
	Leu	Gly	His	Ile	Ser	Arg	Gly	Pro	Ser	Leu	Gly	His	Ile	Ser	Arg	Gly
			420						425					430		
35	Pro	Arg	Leu	Gly	His	Ile	Ser	Arg	Glu	Pro	Arg	Met	Gly	His	Ile	Ser
		435						440					445			
	Arg	Glu	Pro	Arg	Met	Gly	His	Ile	Ser	Arg	Val	Leu	Arg	Leu	Glu	His
		450					455					460				
	Thr	Thr	Met	Leu	Met	Met	Leu	Ala	Arg	Leu	Met	His	Met	Gln	Val	Thr
40	465					470					475					480

## 12

Leu Ala Ile Gln Leu Gln Ala Thr Arg Lys Val Gln Cys Pro Thr Ile  
                     485                    490                    495  
 Pro Met Leu His Leu Arg Ser Gln Gln Ala Ala Val Gln Leu Arg Thr  
                     500                    505                    510  
 5 Pro Gln Glu Ala Ser Met Gly Gln Leu Val Val Leu Asp Ile Leu Leu  
                     515                    520                    525  
 Gly Lys Phe Ser Arg Ala Val Ala Leu Gln Met Gln Arg Lys His Leu  
                     530                    535                    540  
 Leu Leu His His His Arg Gln His His Ile Pro Pro Ala His Met Thr  
 10 545                    550                    555                    560  
 Lys Pro Glu Glu Pro Arg Asp Lys Ile Trp Asp Val Asn Gln Met Asp  
                     565                    570                    575  
 Val Cys His Ala His Leu Leu Ser Arg Gln Ile Trp  
                     580                    585

15

<210> 5  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

20

<220>  
 <223> Oligonucleotido E1

25

&lt;400&gt; 5

gattctccct gataag

16

30

<210> 6  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

35

<220>  
 <223> Oligonucleotido ANCHOR

&lt;400&gt; 6

ggccaggcgt cgactagtag gggiigggi gggiig

36

40

<210> 7  
 <211> 18  
 <212> DNA



13

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotido E2

5

<400> 7

gttctccagc atctccag

18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 03/00247

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N1,A23L

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N15/54, C12N9/10, A23L1/0562

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT,EPODOC,BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0693556 A1 (AJINOMOTO Co.) 24.01.1996 1 page 5, lines 24-42, page 7 lines 20-38.	1-12
Y	Villalobos E. et al. IMMUNOGOLD LOCALIZATION OF 1 A TRANSGLUTAMINASE RELATED TO GRANA DEVELOPMENT IN DIFFERENT MAIZE CELL TYPES. Protoplasma 2001 Vol 316 (3-4), pages 155-163.	1-12
A	EP 555649 A2. (AJINOMOTO Co) 18.08.1993 1	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 JUL 2003 (10.07.03)

Date of mailing of the international search report

21 JUL 2003 (21.08.03)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 03/00247

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP0693556A	24.01.1996		
		WO9520662A	03.08.1995
		US5736356A	07.04.1998
EP0555649A	18.08.1993		
		JP6225775A	16.08.1994
		US5514573A	07.05.1996
		US5607849A	04.03.1997

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 03/00247

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> C12N1,A23L

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

CIP<sup>7</sup> C12N15/54, C12N9/10, A23L1/0562

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT,EPODOC,BIOSIS

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	EP 0693556 A1 (AJINOMOTO Co.) 24.01.1996 1 pagina 5, lineas 24-42, pagina 7 lin 20-38.	1-12
Y	Villalobos E. et al. IMMUNOGOLD LOCALIZATION OF 1 A TRANSGLUTAMINASE RELATED TO GRANA DEVELOPMENT IN DIFFERENT MAIZE CELL TYPES. Protoplasma 2001 Vol 316 (3-4), paginas 155-163.	1-12
A	EP 555649 A2. (AJINOMOTO Co) 18.08.1993 1	1-12

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
10 Julio 2003 (10.07.2003)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional  
21 JUL 2003 21.07.03

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda internacional O.E.P.M.  
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.  
N° de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado  
J. Manso Tomico  
N° de teléfono + 34 91 3495583

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 03/00247

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP0693556A	24.01.1996		
		WO9520662A	03.08.1995
		US5736356A	07.04.1998
EP0555649A	18.08.1993		
		JP6225775A	16.08.1994
		US5514573A	07.05.1996
		US5607849A	04.03.1997